

しかしながら、本発明の [Met(O)^{d, 18}] n PTH - (1-3-4) ベプチドは上記各作用のうち尿中カルシウム低下作用のみを有し、他の作用を有しない特徴を有し、尿中カルシウム低下作用のみを必要とする病症に有用な物質である。

本発明のベプチド[1]は、その方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。塩としては無機酸塩、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩である。また本ベプチド[1]はある種の無機物質または有機物質を付加して錯体を形成し得る。この錯体とは、添加した時に生成し、ベプチドに持続作用を与える化合物を意味する。

本発明のベプチド[1]を製造するには、公知の n PTH - (1-3-4) ベプチド [Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 335, 415, (1974)] を水溶液中、緩和な酸化剤、例えば過酸化水素水で酸化することにより行われる。上記の酸化反応は、通常室温で充分に進行する。得られた反応液

に水を加え、凍結乾燥することにより目的とするベプチド[1]が得られる。

また、本発明のベプチド[1]は、式[1]で示されるアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護された低級ベプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階で N 末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離する別法によつても得られる。縮合反応自体はベプチド合成のための常法手段に従つて、保護基の離脱、縮合反応を繰り返すことにより行われる。即ち、本ベプチド[1]の原料ならびにすべての中間体の製造において使用される各種保護基はベプチド合成で既知の保護基が用いられる。この上のような保護基はベプチド合成化学の分野の文献ならびに参考書に記載されている、例えば、ローハミノ基の保護に t-ブチルオキシカルボニル基を用い、N 末端の α-アミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基を用い、リジンの ε-アミノ基の保護に 0-クロロベンジルオキシカルボニル基を用い、α-カルボキシル基の保護

にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基を用い、セリンの水酸基の保護にベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基の保護にメチチレン-2-スルホニル基を用いるのが好ましい。

本目的化合物[1]の合成においては、個々のアミノ酸および(または)低級ベプチドの縮合は、例えば、保護されたローハミノ基および活性化末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはベプチドと遮離のローハミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはベプチドとを反応させることにより実施することができる。

この場合、カルボキシル基は、例えば酸アンド、酸無水物、酸イミダゾリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、p-ニトロフェニルエステル、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル、2, 4, 5-トリクロロフェニルエステルなどに変換することによつて活性化することができる。またカルボジイミド、例えば N, N'-ジシ

クロヘキシカルボジイミド、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、N, N'-カルボニルジメタゾール、イソオキソリクム塩、例えばウクトドワード反応剤などの縮合剤を使用して反応させることによつて活性化することができる。

本発明において好ましい縮合方法は、アンド法、活性エステル法、ビュンシュ法 [Z. Naturforsch., 21b, 426 (1966)] またはガイガー法 [Chem. Ber., 103, 788 (1970)]などを用いるのが適する。縮合順序は式[1]で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序からも合成し得るが、C 末端側から順次アミノ酸および(または)ベプチドを連結させるのが好ましい。

メチオニンはそれ自体で酸化してから使用してもよいし、メチオニンを含む適當なベプチドフラグメントを得た段階で酸化してもよい。

上記の縮合反応におけるローハミノ基の保護基、例えば t-ブチルオキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸で脱離される。α-カルボキシル基の保

酸基、例えばメチルエステルはこれを希薄な水酸化ナトリウム溶液で分解し、またはヒドロキシドあるいはトリクロロエキシカルボニルヒドロキシドのような保肝ヒドロキシドに変えることができる。

こうして保肝されたN末端アーノミノ基、 ϵ -アミノ基、C末端カルボキシル基、側鎖カルボキシル基、グアニジノ基および(または)水酸基を有するテトラトリアコンタペプチドが得られる。これらの保肝薬は、好ましくは酸分解、例えば無水酢化水素によって一段階で脱離される。

このようにして得られたペプチド[1]は、ペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段によつて分離精製することができる。例えば、セファデックスG-25、セファデックスG-50、セファデックスLH-20などのゲル遮過剤を用いるグルーピング、カルボキシメチセルロース、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィーなどにより行うことができる。

次に、本発明のペプチド[1]の生物学的活性について述べる。

①測定結果

hPTH-(1-34)における血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC-AMPを測定した結果は、第1図の通りであつて、血中カルシウム上昇作用、血中リン低下作用、尿中カルシウム低下作用、尿中リン上昇作用および尿中C-AMP上昇作用を有する。これに対し[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)における血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC-AMPを測定した結果は、第2図の通りであつて、尿中カルシウム低下作用のみを有し、他の作用を有しない特徴を有する。

(2) hPTH-(1-34)および[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)の腎における25-ヒドロキシビタミンD₃-1位水酸化酵素に及ぼす影響

②試験方法

体重50gのウイスターラット(オス)をビタミン剤欠乏食(0.45%カルシウム、0.3%リンを含む)にて飼育し、6週目にペントバルビタ

(1) hPTH-(1-34)および[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)の血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC-AMPに及ぼす影響

③試験方法

標準食で飼育した体重300gのSprague-Dawley(S.D.)ラット(オス)の大鼠動脈にカニューレを挿入し、4%グルコース、5mM CaCl₂、5mM MgCl₂、2.0mM NaO₂、2.5mM KClを含む栄養液を3ml/時間の速度で各々hPTH-(1-34)ペプチドおよび[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)ペプチド2μg/時間と共に持続的に注入した。両ペプチドの投与は各1時間行い、血中および尿中のカルシウム濃度は厚子吸光計(日立208)で測定し、血中および尿中の無機リン量はGoldenbergおよびFernandezの方法[Clinical Chemistry, 12, 871(1966)]で測定し、また尿中のC-AMPはHonmaらの方法[Biochem. Med., 18, 257(1977)]で測定した。

ル(50mg/100ml)を静脈注射して麻酔させ、甲状腺、副甲状腺摘除術を行つた。次に左大鼠動脈にカニューレを挿入し、前記栄養液を3ml/時間の速度で各々hPTH-(1-34)および[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)1.5μg/時間と共に持続的に注入した。両ペプチドの投与は各1時間行い、注入開始24時間後に³H-25-ヒドロキシビタミンD₃(9c³/mM)0.5μCiを静注し、その6時間後に大鼠動脈カニューレより採血した。血漿は血凝分離し、BlighおよびDyerの方法(Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911(1959))に従い、血中³H-1, 25-ヒドロキシビタミンD₃の量を求めた。

④測定結果

測定した結果は第1表の通りであつて、hPTH-(1-34)は腎でのビタミンDの1位水酸化酵素活性の上昇作用を有するが、[Met(O)^{8, 18}]hPTH-(1-34)は上記作用を有しない。

第 1 表

被験薬	[³ H] 1, 25-シビドロキシビタミン D ₃ (pM/100mL)
無添加	12.2±0.6
h P T H-(1-34)	27.5±2.8
[Met(O) ^{B, 18}] h P T H-(1-34)	14.4±1.3

次に、実施例を挙げて本発明の製造例について述べる。

実施例 1

[Met(O)^{B, 18}] h P T H-(1-34) :
H - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Glu -
Leu - Met(O) - His - Asn - Leu - Gly -
Lys - His - Leu - Asn - Ser - Met(O) -
Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu - Arg
- Lys - Lys - Leu - Glu - Asp - Val -
His - Asn - Phe - OH

h P T H-(1-34) ; H - Ser - Val - Ser -
Glu - Ile - Glu - Leu - Met - His - Asn -
Leu - Gly - Lys - His - Leu - Asn - Ser -
Met - Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu -
Arg - Lys - Leu - Glu - Asp - Val -
His - Asn - Phe - OH 1.0 mg を水 2.5 mL に溶かし、これに約 1% 過酸化水素 2.50 μL を加え、37°C で 30 分間処理した。反応液に水 2.25 mL を加え凍結乾燥して [Met(O)^{B, 18}] h P T H-(1-34) を得た。収量

アミノ酸分析 :

(1) 酸加水分解 (2% テオグリコール酸を含む 6 N 塩酸 0.5 mL での t 0.5°C, 24 時間加水分解) ; Asp 4.11(4)、Ser 2.46(3)、Glu 5.10(5)、Gly 1.02(1)、Val 2.83(3)、Met 1.97(2)、Ile 0.97(1)、Leu 5.00(5)、Phe 0.95(1)、Lys 3.11(3)、His 2.44(3)、Arg 1.97(2)、Trp 0.85(1)

(2) 酯素分解 (トリプシンで 37°C, 1 時間、アミノペプチダーゼ M で 37°C, 24 時間酵素分

解) ; Asp 1.25(1)、Asn 3.29(3)、Ser 2.82(3)、Glu 3.00(3)、Gin 1.27(2)、Gly 1.26(1)、Val 3.27(3)、Met(O) 2.57(2)、Ile 1.15(1)、Leu 5.00(5)、Phe 1.10(1)、Lys 3.22(3)、His 2.35(3)、Arg 1.90(2)、Trp 0.71(1)

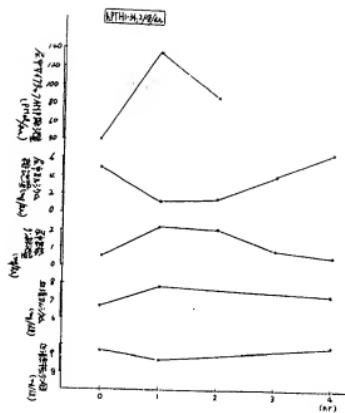
薄層クロマトグラフィー [担体: メルク社製セルロース、展開溶媒: ブタノール-ビリジン-酢酸-水 (1.5 : 1.0 : 3 : 1.2) ; Rf = 0.50
[h P T H-(1-34)] ; Rf = 0.59]

本図面の簡単な説明

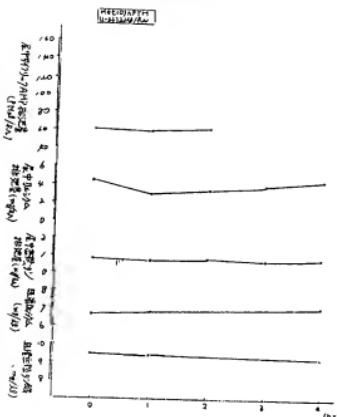
第 1 図は公知の h P T H-(1-34) ベプチドの血中カルシウム、血中リン、尿中カルシウム、尿中リンおよび尿中 C - AMP IC 及ぼす影響を示す曲線を表わし、第 2 図は本発明の [Met(O)^{B, 18}] h P T H-(1-34) ベプチドの血中カルシウム、血中リン、尿中カルシウム、尿中リンおよび尿中 C - AMP IC 及ぼす影響を示す曲線を表わす。

特許出願人
東洋製薬株式会社
代表者 (高田哲男)

第一圖



第二圖



手 続 検 正 書

昭和58年7月8日

特許庁長官 若杉和夫 原

1. 事件の表示

昭和58年特許第75607号

2. 発明の名称

〔Met(O)^{4,9}〕hPTH-(-34)ペプチド

3. 検正をする者

事件との關係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三幡632番地の/

名称 東洋酵母株式会社

代表者 高田哲

4. 検正命令の日付

自発

5. 検正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 検正の内容

明細書第3頁第20行の

「供給する。」を

「進行する。」と訂正する。

明細書第2頁第2行の

「ヒドウチド」を

「ヒドウチド」と訂正する。

明細書第8頁第1行の

「厚子」を

「原子」と訂正する。

明細書第10頁第8行の

「(9ci/mM)」を

「(9Ci/mM)」と訂正する。

明細書第12頁第1行の

「アミノ酸分析；」を

「アミノ酸分析；ノロコ」と訂正する。



特開昭59-204159(6)

手 機 業 正 務

昭和59年1月18日

特許庁長官 着 木 和 夫 敬

1. 事件の表示

昭和58年特許願第75607号

2. 発明の名称

(Met (O)^{2,18}) H P T H - (/ - 34)

ペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三福632番地

の /

名称 東洋創造株式会社



代表者 高田哲

4. 補正命令の日付

(自発)

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の項

6. 補正の内容

明細書第7頁第2行の

「ナトリウム溶液で分解し、」を

「ナトリウム溶液で分解して遊離のカルボキシル基にできる。」と補正する。

明細書第2行の

「ヒドロキシドを

「ヒドロキシド」と補正する。